



Mariane Leão Freitas

**CENTRIFUGAÇÃO COM LEITE DESNATADO PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE GARANHÕES DA
RAÇA MANGALARGA MARCHADOR**

Brasília DF

2013

Mariane Leão Freitas

**CENTRIFUGAÇÃO COM LEITE DESNATADO PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE GARANHÕES DA
RAÇA MANGALARGA MARCHADOR**

Monografia apresentada para a conclusão
do curso de Medicina Veterinária da
Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária da Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Brasília DF

2013

Centrifugação com leite desnatado para criopreservação do sêmen de
garanhões da raça Mangalarga Marchador

Mariane Leão Freitas

BANCA EXAMINADORA

.....

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

.....

Prof. Dr. Ivo Pivato

.....

Dr. José de Oliveira Carvalho

Brasília DF

2013

FREITAS, Mariane Leão

Centrifugação com leite desnatado para criopreservação do
sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador – Orientação Prof.
Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira – Brasília DF 2013.

40 p. : il.

Monografia – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia
e Medicina Veterinária, 2013

1. Centrifugação 2. Garanhão 3. Leite desnatado 4. Sêmen

Nome do autor: Mariane Leão Freitas

Título da Monografia de Conclusão de curso: Centrifugação com leite desnatado
para criopreservação do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador/
Mariane Leão Freitas; orientação de Rodrigo Arruda de Oliveira – Brasília 2013

Ano: 2013

É concedida a Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias
desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos
acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e
nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por
escrito do autor.

Mariane Leão Freitas

025.454.681-18

Condomínio Solar de Brasília, quadra 2 conjunto 6 casa 22 – Setor Habitacional
Jardim Botânico.

Brasília-DF/Brasil

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por iluminar o meu caminho. Aos meus anjos da guarda por me protegerem, e à São Francisco por me abençoar.

Aos meus pais, Lilian e Ylani, por todo amor e incentivo, e por serem os meus maiores exemplos.

Às minhas irmãs, Daniele e Tatiana, por sempre estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida.

À toda a minha família, por todo o apoio e carinho.

Ao meu orientador Prof. Rodrigo Arruda de Oliveira pelos ensinamentos, pelo auxílio em todos os momentos e pela confiança depositada em mim.

Ao Médico Veterinário Francisco José Gonçalves de Oliveira que me apoiou de forma excepcional e, sem o qual, não seria possível realizar esse trabalho.

Aos proprietários das fazendas Sete Lagoas e Sete Ranchos por cederem os animais do trabalho e aos seus respectivos funcionários pela ajuda na realização do experimento.

Aos animais utilizados no experimento.

Aos colegas de graduação Cristiano Bouéres, Cássio Batista Chagas e Filipe Martim, por toda ajuda prestada diretamente na realização deste trabalho.

À Dra Margot Alves Nunes Dode, à mestrande Andrielle Mendes e à EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia, que colaboraram para a realização do experimento através da disponibilização do sistema automatizado de análise espermática.

Ao Dr Carlos Frederico Martins, à mestrande Elisa Ribeiro da Cunha e à EMBRAPA – Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira, que colaboraram para a realização do experimento através da disponibilização das sondas de fluorescência.

À todos os amigos conquistados durante esses cinco anos de graduação.

Ao Giuliano Gaglianone Passani, por me amar e me apoiar em todos os momentos, com muita paciência e carinho.

Por ultimo, ao meu cachorro Big Newton que, desde cedo, me ensinou a beleza dessa profissão e, a cada dia, me inspira e me abençoa com o seu amor incondicional.

RESUMO

O congelamento de sêmen trouxe vários benefícios ao sistema de produção de equinos, facilitando o armazenamento por período indeterminado e a comercialização desse material genético. Também permite o controle de doenças sexualmente transmissíveis, propicia que a colheita de sêmen possa ser realizada durante todo o ano, mesmo fora da estação de monta e principalmente acelera o ganho genético, sendo a melhor forma de preservar o material genético de garanhões de alto valor zootécnico. Porém, os custos desse procedimento são muito elevados, gerando um empecilho para a difusão dessa biotecnologia. Uma das formas de diminuir custos do congelamento de sêmen é buscando diluentes alternativos e mais baratos para a centrifugação, que consigam exercer a mesma função do diluente comercial, sem prejudicar os espermatozoides. O objetivo deste estudo foi comparar o leite desnatado UHT e o diluente comercial utilizados durante o processo de congelamento do sêmen. Após o descongelamento do sêmen, foram realizadas análises da cinética espermática computadorizada, integridade de membrana plasmática e acrossomal através de sondas de fluorescência, e da viabilidade espermática com o corante eosina-nigrosina. O sêmen centrifugado com o leite desnatado UHT não diferiu do sêmen centrifugado com diluente comercial, em todas as análises ($P>0,05$). Considerando que o leite desnatado UHT apresenta um custo de aproximadamente 2,5% do valor do diluente comercial, essa passa a ser uma alternativa de baixo custo para a substituição do diluente comercial, tornando o processo de congelamento do sêmen economicamente mais interessante.

Palavras-chave: congelamento de sêmen, equino, espermatozoide, leite UHT.

ABSTRACT

The use of frozen semen brought several benefits to the equine production system, enabling storage for an indefinite period and the commercialization of genetic material. It also allows control of sexually transmitted diseases, and promotes that the semen collection be performed throughout the year, even outside of the breeding season, and mainly accelerating genetic gain. Besides, is the best way to preserve the genetic material of valuable stallions. However, the costs of this procedure are very high, generating an obstacle to the diffusion of this biotechnology. One way to reduce costs of semen cryopreservation is looking for alternative and more affordable extenders, that can perform the same function as the commercial extender, without harming sperm. The purpose of the present study was to compare the UHT skimmed milk and the commercial extender used during the semen cryopreservation process. After the semen straws were thawed, were performed computerized analyzes of the sperm movement, analyzes of integrity of the plasma and acrossomal membranes through fluorescent probes and eosin-nigrosin staining for assessment of sperm vitality. The semen centrifuged with UHT skimmed milk did not differ from the the semen centrifuged with commercial extender, in all analyzes performed ($P>0,05$). Considering that the UHT skimmed milk presents a cost of approximately 2.5% of the value of commercial extender, this becomes a low-cost alternative for replacement of commercial extender, making the process of centrifugation of the semen economically more interesting.

Key words: Semen cryopreservation, equine, sperm, UHT milk.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Materiais e Métodos	3
3. Resultados	6
4. Discussão	7
5. Conclusões	8
6. Referências	9
7. Relatório de Estágio	13
7.1 Introdução	13
7.2. Rotina da Fazenda Sete Lagoas	18
7.3. Rotina do Estagiário	18
7.4. Atividades desenvolvidas	19
7.5. Conclusão	25
ANEXO I	26
ANEXO II	29
ANEXO III	30
ANEXO IV	31

1. Introdução:

A equinocultura forma no Brasil uma importante cadeia do agronegócio com forte interrelação com setores ligados ao lazer, cultura e turismo, o que coloca o Brasil como o quarto maior rebanho do mundo, com 5,9 milhões de animais, atrás apenas da China, Estados Unidos e México (LIMA et al., 2012).

A produção de equinos emprega diretamente mais de 640 mil pessoas no país, o que gera de forma indireta 3,2 milhões de empregos e movimenta 7,5 bilhões de reais, com destaque para a movimentação de insumos, rações, selas, acessórios, centros de criação e treinamento, medicação, tratamentos veterinários, atividades esportivas, ensino e pesquisa (ALMEIDA & SILVA, 2010). Esses números demonstram a dimensão da equinocultura na economia nacional.

A ampla utilização das biotecnologias trouxe, ao longo dos anos, benefícios aos criadores de cavalos de diversas raças e, com isso, a possibilidade de aumentar o número de produtos obtidos por ano de animais de genética superior. Em relação à reprodução equina, várias tecnologias se tornaram difundidas e comuns, tais como a inseminação artificial, a transferência de embriões e a manipulação de sêmen (GOMES & GOMES, 2009). No entanto, algumas biotécnicas ainda não alcançaram o seu total aperfeiçoamento técnico dentro da reprodução de equinos, como é o caso da criopreservação de sêmen (FAGUNDES et al., 2011).

O congelamento de sêmen trouxe vários benefícios ao sistema de produção de equinos, facilitando o armazenamento por período indeterminado do sêmen e a comercialização desse material genético. Também permite o controle de doenças sexualmente transmissíveis, propicia que a colheita de sêmen possa ser realizada durante todo o ano, mesmo fora da estação de monta e principalmente acelera o ganho genético, sendo a melhor forma de preservar o material genético de garanhões de alto valor zootécnico (MILLER, 2008).

Entretanto, a menor taxa de fertilidade do sêmen congelado, comparada à do sêmen fresco, constitui um dos maiores entraves à plena difusão dessa biotecnologia. Esta redução da taxa de fertilidade verificada após o processo de congelamento está relacionada, principalmente aos danos causados à estrutura e ao funcionamento das membranas dos espermatozoides (PARKS & GRAHAM, 1992).

Essas injúrias têm sido identificadas por meio de testes *in vitro* que avaliam a integridade e funcionalidade da membrana do espermatozoide.

Os grandes entraves encontrados neste contexto se referem ao menor potencial fertilizante do espermatozoide após o descongelamento, os maiores custos com materiais, inseminação no momento mais próximo possível da ovulação e as particularidades entre garanhões da mesma raça e de raças diferentes (MILLER, 2008).

É sabido que dentre as raças equinas existem diferenças relativas às características reprodutivas e quando as biotecnologias da reprodução são utilizadas, os resultados se refletem em baixa fertilidade, tanto quando se utiliza sêmen refrigerado, quanto congelado. (GOMES & GOMES, 2009).

A raça Mangalarga Marchador, distribuída em todo o País, é a mais numerosa raça equina brasileira (COSTA et al., 2004). Porém, o sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, é considerado de baixa congelabilidade e merece uma atenção especial quando se trata de congelamento de sêmen (GOMES et al., 2002).

Para contornar esses problemas, ocorreram avanços na técnica de congelamento de sêmen equino que incluem diluidores modificados com novas substâncias crioprotetoras, mudanças na técnica propriamente dita, e novas metodologias de inseminação artificial.

Durante o processo de congelamento, o sêmen deve ser diluído para que se realize a centrifugação, com a finalidade da remoção de grande parte do plasma seminal, e concentração do ejaculado para posterior adição do diluente de congelamento (ASHWOOD-SMITH, 1987).

Alguns fatores como a força de centrifugação e o tempo de duração da centrifugação (PICKETT et al., 1975), o diluente utilizado para centrifugação (MARTIN et al., 1979; COCHRAN et al., 1984), a porcentagem de plasma seminal retirada (JASKO et al., 1991) e o diluente utilizado na ressuspensão do sêmen após a centrifugação influenciam na qualidade do sêmen.

A substituição do diluente comercial, utilizado para a centrifugação do sêmen, por outros meios pode apresentar bons resultados, além de diminuir custos. Dentre estes meios, o leite desnatado UHT pode ser uma alternativa, pois é um fluido biológico de composição complexa, que consiste basicamente em uma emulsão de

gordura em uma solução aquosa, contendo proteínas, lactose, sais minerais e pequenas quantidades de enzimas e vitaminas (BATELLIER et al., 1997).

O objetivo deste estudo foi comparar o leite desnatado UHT e o diluente comercial, utilizados durante o processo de criopreservação do sêmen equino, avaliando as características espermáticas após o descongelamento do sêmen.

2. Materiais e Métodos:

2.1. Animais:

Foram utilizados sete garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade variando entre quatro e onze anos, com histórico de vida reprodutiva conhecido e sem alterações clínicas detectáveis. Os animais estavam na região de Brasília, DF, em cocheiras de 20 metros quadrados, alimentados com capim elefante, ração concentrada com 13% de proteína bruta (PB), e suplemento mineral para equinos. As reservas extragonadais dos garanhões foram esgotadas com uma colheita diária por sete dias seguidos. Uma semana após o término do esgotamento, começaram as colheitas para o congelamento do sêmen. Foram realizados dois congelamentos de sêmen de cada garanhão, totalizando 14 ejaculados criopreservados. Cada ejaculado foi avaliado quanto a motilidade total, vigor, integridade de membrana plasmática e concentração, conforme normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998.

2.2. Congelamento de sêmen:

Para o congelamento, foram utilizados apenas os ejaculados com motilidade $\geq 60\%$ e vigor ≥ 3 . Após a colheita e análise, o sêmen foi separado em dois grupos: grupo controle (diluição 1:1 em meio comercial BotuSemen® - BOTUPHARMA, Botucatu/SP) e grupo leite (diluição 1:1 em leite desnatado UHT). Após a diluição, o sêmen foi centrifugado (600g) por 10 minutos e 90% do plasma seminal descartado. O pellet resultante foi ressuspenso com crioprotetor (BotuCrio® - BOTUPHARMA, Botucatu/SP), e a concentração foi ajustada para 200×10^6 spz/mL. Em seguida, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, lacradas e identificadas. As palhetas

foram estabilizadas em uma temperatura de 5 °C por 20 minutos, sendo posteriormente, dispostas horizontalmente em uma plataforma a 6 cm de distância do nível do nitrogênio líquido por mais 20 minutos. Ao término desse processo, as palhetas foram mergulhadas diretamente no nitrogênio líquido, e armazenadas em botijão criogênico.

Para o descongelamento do sêmen, as palhetas foram colocadas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. E o sêmen disposto em um tubo de microcentrífuga que permaneceu no banho-maria por mais cinco minutos. Foram descongeladas uma palheta de cada partida por garanhão, para as avaliações pós-descongelamento.

2.3. Avaliação espermática:

As avaliações pós-descongelamento foram: Avaliação da cinética espermática computadorizada, avaliação das membranas com o uso de sondas fluorescentes e viabilidade espermática.

A cinética espermática foi avaliada pelo sistema automatizado CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*). Para esta avaliação, o sêmen foi diluído com soro Ringer Lactato, permanecendo com uma concentração entre 25×10^6 e 50×10^6 spztz/mL. Após a diluição, 10 µL de sêmen foram colocados na lâmina de leitura (Makler® counting chamber, Selfi-medical instruments, Califórnia, EUA), sendo a amostra avaliada no aparelho modelo Ivos-Ultimate 12 da *Hamilton Thorne Biosciences*, previamente ajustado (SETUP equino; Anexo II). Três campos foram selecionados para leitura e análise. As variáveis mensuradas foram (Anexo I): Motilidade total (%; MT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade de trajeto (µm/s; VAP), velocidade retilínea (µm/s; VSL), velocidade curvilínea (µm/s; VCL), amplitude lateral de cabeça (µm; ALH), frequência de batimentos (Hz; BCF), linearidade (%; LIN) e retilinearidade (%; STR).

Para avaliação da integridade de membrana plasmática, foram utilizadas sondas fluorescentes como iodeto de propídeo (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) através da técnica de Harrison & Vickers (1990), com microscopia de epifluorescência (Anexo III).

Para integridade da membrana acrossomal foi utilizado a sonda fluorescente isotiocionato de fluoresceína conjugado com aglutinina de amendoim (*Arachis*

hypogea) (FITC-PNA), como descrito por Klinc e Rath (2007). Foram avaliados 200 células em microscopia de fluorescência de contraste de fase no aumento de 1000x (Anexo IV).

Para avaliação da viabilidade espermática foi utilizada a coloração supravital com o corante eosina-nigrosina, com volumes iguais (20 µL) de sêmen e corante colocados sobre lâmina de vidro, identificada e aquecida a 37 °C, homogeneizados, realizando-se o esfregaço, os quais foram secos ao ar. A leitura foi realizada em aumento de 1000x, contando-se 500 espermatozóides, imediatamente após secagem da lâmina e classificando-se os não corados como aqueles com membrana íntegra (DOTT & FOSTER, 1972).

2.4. Análise estatística:

As análises de crítica e consistência dos dados foram realizadas por meio do procedimento UNIVARIATE do Statistical Analysis System (SAS) para determinar se os erros experimentais das variáveis possuíam distribuição normal de probabilidade e homogeneidade de variância (LITTELL et al., 2002).

Análises de variância foram realizadas utilizando-se o método dos quadrados mínimos por meio do procedimento GLM do SAS e as médias ajustadas obtidas através da opção LSMEANS do mesmo (LITTELL et al., 2002). O seguinte modelo foi utilizado:

$$Y_{ij} = \mu + Tr_i + e_{ij}$$

Y_{ij} : observação do animal j, pertencente ao i-ésimo tratamento;

μ : média geral da variável dependente em estudo;

Tr_i : efeito fixo do i-ésimo tratamento;

e_{ij} : erro aleatório associado a cada observação ij, pressuposto normalmente distribuído e independente com média zero e variância σ^2 .

Para a comparação das médias entre tratamentos foi realizado o teste de Tukey, obtido por meio da opção LSMEANS do procedimento GLM do SAS (LITTELL et al., 2002). Os valores reportados estão expressos na forma de média ajustada pelos

quadrados mínimos e desvio padrão da média (dp). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

3. Resultados:

Os resultados pós-descongelamento são apresentados nas Tabelas 1 e 2. Para todos os parâmetros avaliados pelo CASA não houve diferença ($P > 0,05$) entre o grupo leite (leite desnatado) e o grupo controle (diluyente comercial).

TABELA 1 – Resultados percentuais das análises pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador ($n=7$), centrifugados com leite desnatado e em diluyente comercial, referentes à avaliação computadorizada: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$; VAP), velocidade retilínea ($\mu\text{m/s}$; VSL), velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$; VCL), amplitude lateral de cabeça (μm ; ALH), frequência de batimentos (Hz; BCF), linearidade (%; LIN) e retilinearidade (%; STR).

Trat.	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Controle	42,71	12,29	43,94	35,91	77,34	3,43	44,61	82,29	47,86
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	17,53	8,08	5,00	4,01	9,42	0,53	1,98	4,89	5,05
Leite	38,29	7,86	41,54	33,74	74,81	3,86	43,56	81,71	47,00
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	12,58	3,93	4,41	2,51	10,01	0,81	2,11	3,68	5,16

Nas avaliações de integridade de membrana plasmática, acrossomal e viabilidade espermática (Tabela 2), não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre o grupo leite e o grupo controle.

TABELA 2 – Resultados percentuais das análises pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador ($n=7$), centrifugados com leite desnatado e em diluyente comercial, referentes a integridade de membrana plasmática, acrossomal e viabilidade espermática.

Trat.	Membrana plasmática (%)		Membrana Acrossomal (%)		Viabilidade (%)	
	Íntegra	Lesada	Íntegra	Lesada	Víavel	Não víavel

Controle	53,43±10,98	46,57±10,98	93,29±4,27	6,71±4,27	84,05±6,06	15,95±6,06
Leite	60,14±8,76	39,86±8,76	93,71±3,9	6,29±3,9	81,48±8,41	18,52±8,41

4. Discussão:

No presente estudo, os resultados pós-descongelamento obtidos através das avaliações da cinética espermática, da integridade de membrana plasmática e de membrana acrossomal, e da viabilidade espermática, demonstraram que não houve diferença, na utilização do leite desnatado na centrifugação em relação ao diluente comercial.

Não há na literatura nenhum trabalho descrevendo a centrifugação apenas com leite desnatado, em nenhuma raça, apenas com a variação do diluente de Kenney et al. (1975), à base de leite em pó desnatado, glicose e bicarbonato.

Pagl et al. (2006) constataram que diluentes a base de leite tem um efeito positivo na atividade antioxidante em sêmen diluído, e assim, neutralizam os efeitos potencialmente negativos da centrifugação, que podem ocorrer no sêmen fresco. Batellier et al. (2001) também relataram, que a proteção conferida pelos componentes do leite estaria relacionada aos seus efeitos antioxidantes.

Recentemente, estudos indicaram que as micelas de caseína, a α -lactalbumina e a β -lactoglobulina, principais proteínas do leite, interagem com as proteínas presentes no plasma seminal, e que essa interação parece ser importante para a proteção do espermatozóide durante o armazenamento. Além disso, a interação entre as caseínas ou as proteínas do soro com as proteínas plasmáticas permanecem estáveis após o descongelamento do sêmen (MANJUNATH, 2012).

Schmitt (2002) avaliou o leite desnatado UHT e diluente comercial para refrigeração do sêmen e observou que o percentual de espermatozoides com membrana íntegra foi superior nas amostras diluídas em leite desnatado do que nas diluídas em diluente comercial, nas 72 h de armazenamento.

Mattos (1995), ao comparar o diluente leite desnatado e o diluente Kenney com diferentes antibióticos, observou que o leite desnatado foi significativamente superior aos diluentes Kenney com amicacina e Kenney com polimixina B na preservação da motilidade progressiva e total do sêmen resfriado a 4 °C.

Os primeiros trabalhos descritos sobre centrifugação de sêmen equino relatam um efeito negativo sobre a motilidade espermática (MacLEOD & McGEE, 1950; BUELL, 1963). Bader (1970) centrifugou 38 ejaculados de garanhões com o objetivo de comparar o efeito desse método com a coleta fracionada do sêmen que era utilizada anteriormente. O autor observou um decréscimo na motilidade do sêmen centrifugado a 500 g sem diluição prévia. Martin et al. (1979) estudaram o efeito da diluição do sêmen com EDTA-glicose antes da centrifugação a 1000 g por 5 min, comparando a motilidade pós-congelamento, as amostras diluídas/centrifugadas apresentaram melhor motilidade em relação às não diluídas/centrifugadas.

Uma das formas de diminuir custos do congelamento de sêmen é buscando diluentes alternativos e mais baratos para a centrifugação, que consigam exercer a mesma função do diluente comercial, sem prejudicar os espermatozoides. O meio comercial utilizado no grupo controle do experimento foi o BotuSêmen®, que é uma variação da receita publicada por Kenney et al. (1975), e é encontrado numa média de preço de R\$12,00 cada unidade contendo 100 mL.

O leite desnatado UHT é encontrado com facilidade em mercados, e custa em média R\$2,95 a unidade contendo 1L. Como se pode observar, o leite desnatado UHT é um diluente bem acessível, que vem em uma quantidade dez vezes maior que o diluente comercial, dessa forma apresentando um custo de aproximadamente 2,5% do valor do diluente comercial, sendo uma alternativa, com um enorme benefício econômico.

5. Conclusões:

O leite desnatado UHT, utilizado como único diluente do sêmen para a centrifugação durante o processo de congelamento é suficiente para a proteção do espermatozoide. Pode ser usado em substituição ao diluente comercial diminuindo custos do procedimento de congelamento de sêmen equino.

6. Referências Bibliográficas:

ALMEIDA, F.Q.; SILVA, V.P. Progresso Científico em Equideocultura na 1ª Década do Século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.119-129, 2010.

ASHWOOD-SMITH, M.J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K.; FULLER, B.J. **Temperature and Animal Cells**. Cambridge: Biologists, p.395-406, 1987.

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v.48, p. 391-417, 1997.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 181-190, 2001.

BUELL, J.R. A method for freezing stallion semen and tests of its fertility. **Veterinary Record**, v.75, p.900-902, 1963.

CBRA (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**: manual de orientação. Belo Horizonte, 1998. 49 p.

COCHRAN, J.D.; AMAN, R.P.; FROMAN, D.P.; PICKETT, B.W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 °C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. **Theriogenology**, v.22, p.25-38, 1984.

COSTA, M.D.; BERGMANN, J.A.G.; REZENDE, A.S.C. et al. Caracterização demográfica da raça Mangalarga Marchador. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.687-690, 2004.

DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.29, p.443-445, 1972.

FAGUNDES, B.; VAN TILBURG, M.F.; SOUZA, G.V.; CAIADO, J.R.C.; BARRETO, M.A.P.; SILVA, J.F.S. Effect of addition of concentrated proteins and seminal plasma low molecular weight proteins in freezing and thawing of equine semen. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v.2, p.1-7, 2011.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002.

GOMES, G.M.; GOMES, L.P.M; Problemas e soluções com o uso de sêmen congelado e refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.6, p.210-215, dez. 2009.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use offluorescent probes to assess membrana integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

JASKO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.35, p.1059-1067, 1991.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: **Proceedings of the 21st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, p. 327, 1975.

KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 63-67, 2007.

LIMA, R.A.S.; OLIVEIRA, R.A.; MENDES, C. Perfil e tendências da Equideocultura Brasileira. **Anais** da 49 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Brasília, p.1-20, 2012.

LITTELL, R. C.; STROUP, W. W.; FREUND, R. J. **SAS® for linear models**. 4. ed., Cary: SAS Institute, 2002, 466p.

MacLEOD, J.; McGEE, W.R. The semen of the thoroughbred. **Cornell Veterinarian**, v.40, p. 233-248, 1950.

MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender componentes. **Animal Reproduction Science**, v.9, n.4, p.809-815, Oct./Dec. 2012.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**. suppl. 27, p.45-51, 1979.

MATTOS, R. Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

MILLER, C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. **Theriogenology**, v.70, p.463-468, 2008.

PAGL, R.; AURICH, J.E.; MÜLLER-SCHLÖSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. **Theriogenology**, v. 66, p. 1115-1122, 2006.

PARKS, E.J.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation proceders on sperm membranas. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.

PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W.; PACE, M.M.; REMMENG, E.E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.26, p.167-174, 1975.

SCHMITT, F.L. A concentração, a composição e a qualidade do plasma seminal na preservação do sêmen equino a 4 °C. Dissertação apresentada ao programa de pós graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 101p. 2002.

7. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Este relatório descreve as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular, realizado na Central de Reprodução Estábulo na Fazenda Sete Lagoas – Fercal/DF, sob orientação do Médico Veterinário Francisco José Gonçalves de Oliveira, CRMV-DF 1540, no período compreendido entre 01 de abril e 26 de Junho de 2013, na área de reprodução de equinos.

7.1. INTRODUÇÃO

A Fercal localiza-se no norte do Distrito Federal, entre Sobradinho e Sobradinho II a uma distância de 30 km do centro de Brasília. Esta cidade possui 29 mil habitantes. A economia é sustentada principalmente pela indústria de cimento e asfalto e pela agropecuária.

A Fazenda Sete Lagoas localiza-se na Fercal, possui uma área de 220 hectares. Como principais atividades a fazenda conta com a criação de animais da raça Mangalarga Marchador, aluguel de baias para animais pensionistas, manejo de éguas doadoras e receptoras de embrião, e a pecuária de leite com a criação de gado da raça Girolanda. A fazenda contava com um total de aproximadamente 30 animais, sendo quatro éguas doadoras de embrião, 20 éguas receptoras, duas éguas utilizadas apenas para inseminação artificial e quatro garanhões.

A área da Fazenda possui seis piquetes (Fig.1), com forragem de capim Colonião (*Panicum Maximum*), com tamanhos variados, delimitados por cercas de arame farpado ou de madeira, além de um pasto de capim Jaraguá e Meloso.



Figura 1 – a) e b) Piquetes da Fazenda Sete Lagoas.

A central de reprodução é composta por um pavilhão contendo 9 baias (Fig. 2), cada uma com 12 metros quadrados, utilizando como cama para o piso das baias, serragem ou feno de qualidade inferior, dependendo da necessidade de cada animal; um laboratório equipado com os principais equipamentos utilizados na reprodução equina, como autoclave, estufa, centrífuga, microscópio, estereomicroscópio e mesa aquecedora, seladora, um escritório, e um depósito.



Figura 2 – a) e b) Baias da Central de Reprodução Estábulo.

Anexo ao laboratório existe um brete de contenção de metal (Fig. 3) utilizado para procedimentos como inseminação artificial, colheita e inovulação de embriões, e uma farmácia contendo medicamentos de emergência. A fazenda ainda conta com mais três cocheiras de 20 metros quadrados e quatro cocheiras de 9 metros quadrados, reservadas para garanhões e cavalos criados na fazenda.



Figura 3 – Brete de contenção de metal da Central de Reprodução Estábulo.

O local reservado para o manejo e controle folicular das éguas receptoras é uma lanchonete coberta, contendo 12 bretes de madeira fechados com cordas. Para colheita de sêmen dentro da central existe um manequim artificial (Fig. 4).



Figura 4 - Manequim artificial para colheita de sêmen na Central de Reprodução Estábulo.

Nove funcionários trabalhavam na Fazenda Sete Lagoas, sendo dois funcionários da central de reprodução e um funcionário do haras que trabalhavam diretamente com os cavalos, três funcionários da fazenda que eram responsáveis pelo gado de leite, uma diarista e dois funcionários da sede da fazenda.

7.2. ROTINA DA FAZENDA SETE LAGOAS

A rotina da Fazenda Sete Lagoas tinha início às 7h da manhã com o início das atividades dos funcionários do haras e da central de reprodução. Os animais estabulados eram soltos em piquetes com Capim Colonião (*Panicum Maximum*), e a sua alimentação era suplementada com capim elefante, ração concentrada 13% de PB e farelo de soja e milho, além de ser fornecida mineralização com sal mineral da Guabi®, Bellman® ou Kromium®. As baias eram higienizadas, com a limpeza das camas e dos cochos de água, ração e sal mineral. Os animais que ficavam em piquetes também recebiam suplementação com capim Colonião e ração concentrada 13% de PB, além da mineralização. As éguas receptoras de embrião que permaneciam no pasto recebiam apenas suplementação mineral.

Existiam duas éguas que estavam na propriedade apenas para o procedimento de inseminação artificial e acompanhamento da gestação até os 60 dias. E quatro éguas doadoras de embrião, que estavam em programa de transferência na fazenda, estas eram palpadas conforme sua necessidade. Quatro garanhões da fazenda eram utilizados para a inseminação das éguas pertencentes a fazenda. Os reprodutores não possuíam dias fixos de colheita, que eram realizadas conforme a necessidade do sêmen.

As 20 éguas receptoras ficavam em um pasto e os funcionários da central de reprodução eram encarregados de levar as éguas até a lanchonete duas a três vezes por semana, para que fosse possível realizar o controle folicular das éguas. Éguas que recebiam embrião e tinham a gestação confirmada, eram separadas das outras e realojadas em piquetes até completarem 60 dias de gestação, quando eram transportadas para as fazendas dos proprietários do embrião.

7.3. ROTINA DO ESTAGIÁRIO

A rotina do estagiário tinha início às 07h30min da manhã, junto com a rotina do Médico Veterinário Francisco José Gonçalves de Oliveira. Todo o material para

as atividades do dia era organizado. As éguas doadoras eram colocadas no brete para o controle folicular e eram realizadas as colheitas de embrião. Em seguida as éguas receptoras eram colocadas na lanchonete para a realização do controle folicular, a aplicação de hormônios, e a transferência de embriões.

No período da tarde, eram realizadas colheitas de sêmen, inseminações artificiais, congelamento de sêmen e outras atividades. No fim da tarde todo o material era organizado novamente, era realizada a limpeza de materiais usados durante o dia, e a esterilização de cateteres uterinos, filtros de embrião, filtro de náilon para sêmen, placas de Petri, entre outros.

7.4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades desenvolvidas (Tabela 1) incluíam controle folicular de éguas receptoras e doadoras, protocolo hormonal em receptoras em anestro, colheita de sêmen, congelamento de sêmen, inseminação artificial, colheita de embrião, inovulação do embrião e diagnóstico de gestação.

TABELA 1. Atividades desenvolvidas durante o estágio curricular na Fazenda Sete Lagoas no período entre 01/04/2013 e 26/06/2013.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	
Controle Folicular	476
Protocolo hormonal em receptoras em anestro	13
Colheita de sêmen	34
Congelamento de sêmen	17
Inseminação artificial	41
Colheita de embrião	46
Inovulação do embrião	28
Diagnóstico de gestação	101

TOTAL	756
--------------	------------

7.4.1. Controle folicular:

Após a contenção das éguas em bretes, era realizada a palpação retal, com auxílio de um aparelho de ultrassonografia (Chison US D 600VET ou Edan DUS-3 VET, com probe linear retal de 5 MHz).

As informações obtidas de cada égua, através da observação e classificação dos ovários (presença e tamanho dos folículos; presença de corpo lúteo, trabeculado ou não; ovulação; folículo hemorrágico), classificação do útero (tônus, presença de edema, homogeneidade, presença de linha de colabamento, além de presença de fluído intrauterino), eram anotadas em uma planilha e posteriormente digitadas em um relatório de atividades mensais.

O tônus uterino era avaliado durante a palpação do útero e classificado de zero a três, sendo zero um útero flácido e três contratilidade uterina máxima; a presença de edema foi observada através de ultrassonografia e classificada de zero a três, sendo zero a ausência de edema e três edema fisiológico máximo; a homogeneidade foi observada através de ultrassonografia e classificada de zero a três, onde zero representa útero heterogêneo e três representa a morfoecogenicidade entre miométrio e endométrio, a presença de linha de colabamento foi observada através de ultrassonografia e classificada de zero a dois, sendo zero ausência de linha de colabamento e dois linha de colabamento bem visível.

7.4.2. Protocolo hormonal em receptoras em anestro:

Éguas receptoras em período de transição ou anestro podem ser utilizadas para o procedimento de inovulação de embrião, desde que seja realizado o protocolo hormonal de suplementação de progesterona. Parte do estágio foi realizado durante o período de transição da estação de monta, por isso muitas éguas encontravam-se em anestro ou em transição.

O tratamento foi realizado por quatro dias consecutivos. No primeiro dia (D 0 – ovulação da doadora), foram aplicados 5 mg de Benzoato de Estradiol (BE) por via intramuscular. No segundo dia, (D 1 – pós-ovulação da doadora), foram aplicados 3 mg de BE por via intramuscular. No terceiro dia (D 2), foram aplicados 2 mg de BE

por via intramuscular. No quarto dia (D 3), foram aplicados 5 mL de Progesterona (P4) também por via intramuscular. A aplicação de Progesterona foi repetida no dia da inovulação (que correspondia ao D 8 da ovulação da égua doadora). Após o diagnóstico de prenhez (aos 15 dias de gestação), passou a ser realizada semanalmente até que se completassem 100 dias de gestação, período em que a placenta assume a produção de progesterona, e a suplementação exógena torna-se desnecessária.

7.4.3. Colheita de sêmen:

Foi utilizada a vagina artificial modelo Botucatu, constituída de tubo rígido, tubo flexível de látex, camisa sanitária e copo coletor. A vagina artificial era montada antes das colheitas de sêmen. Para que a temperatura no interior da vagina ficasse entre 42 e 45 °C, a água era aquecida a 48 °C e colocada com o auxílio de um funil dentro da vagina. Para ajustar a pressão, a vagina era preenchida com ar.

O garanhão era coletado em manequim artificial e estimulado por uma égua no cio. O garanhão, ao ser estimulado pela égua, apresenta excitação, interação com a égua, e ereção; com o pênis em ereção o garanhão realiza o salto, adução de membros, posicionamento e introdução do pênis (que deve ser deslocado para a vagina artificial), com o pênis corretamente posicionado, ocorre a tumefação da glândula, fricção, com aproximadamente sete movimentos, e a ejaculação. Nesse momento a válvula do compartimento de água da vagina artificial deve ser aberta para aliviar a pressão interna da vagina e o ejaculado descer para o copo coletor. Após a ejaculação, ocorre o relaxamento do pênis, descida do manequim e redução da glândula.

Logo após a colheita, o sêmen era filtrado em filtro de náilon para a retirada de sujidades e da fração gelatinosa, era verificado o volume do ejaculado juntamente com o aspecto (cor, densidade) e, através de microscópio óptico, era verificada a motilidade espermática (classificada entre 0% e 100%), o vigor (classificado entre 0 e 5) e a concentração espermática.

Para a motilidade e o vigor, uma gota do sêmen era colocada em uma lâmina e recoberta com a lamínula e observada em microscópio óptico. Para se realizar a concentração espermática, era realizada a diluição do sêmen em 1:20 de solução de formol salina, e essa solução era utilizada para preencher a Câmara de Neubauer.

Aguardava-se 5 minutos para a sedimentação, permitindo a contagem dos espermatozoides em microscópio óptico.

Após a análise, realizava-se a diluição do sêmen, mantendo uma concentração entre 25×10^6 e 50×10^6 de espermatozoides viáveis por mL, em diluente comercial a base de leite em pó desnatado, glicose, tampão bicarbonato e antibióticos (BotuSêmen® - BOTUPHARMA, Botucatu/SP). Antes da diluição o diluente era aquecido a 37 °C para não ocorrer choque térmico nos espermatozoides.

O sêmen era utilizado tanto para a inseminação a fresco imediatamente após a colheita ou transportado para inseminação artificial em outra propriedade. Para isso se utilizava a refrigeração a 15 °C ou 5 °C, ou ainda, era realizado o congelamento do sêmen.

7.4.4. Congelamento de sêmen:

Para o congelamento do sêmen, foi utilizado sêmen fresco ou refrigerado e foram estabelecidos parâmetros mínimos de 60% de motilidade e vigor 3. Após as avaliações iniciais, o sêmen foi diluído a uma concentração entre 25×10^6 e 50×10^6 de espermatozoides viáveis por mL, com a realização da centrifugação a 600g por dez minutos, com a finalidade de remoção da maior parte do plasma seminal, deixando apenas entre 5 e 20% do plasma, e posterior adição do crioprotetor.

Após a centrifugação, foi colocado o diluente de criopreservação (BotuCRIO® - BOTUPHARMA, Botucatu/SP) composto por açúcares, aminoácidos, gema de ovo, glicerol e metilformamida, e realizada a ressuspensão do pellet de sêmen. A concentração de espermatozoides foi ajustada, com a adição do crioprotetor, para manter uma concentração de 200×10^6 de espermatozoides por mL. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, previamente identificadas, e lacrado com seladora própria para palhetas.

Foi realizado a estabilização do sêmen, em geladeira a 5 °C por 20 minutos. Ao término desse tempo o sêmen foi colocado a uma distância de 6 cm do nitrogênio líquido por mais 20 minutos. Por fim, o sêmen foi colocado diretamente em contato com o nitrogênio, raqueado, e armazenado no botijão criogênico. O descongelamento do sêmen foi realizado colocando a palheta com o sêmen em banho-maria a 37 °C por 30 segundos.

7.4.5. Inseminação artificial:

As éguas destinadas a inseminação, que durante a palpação retal apresentavam folículos maiores que 35mm e edema uterino entre dois e três, tinham sua ovulação induzida. A indução pode ser realizada com 2500 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) por via intravenosa, que se liga aos receptores de LH induzindo a ovulação, ou com 1 mg de deslorelina por via intramuscular, que atua como análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), estimulando a síntese e liberação de LH pela hipófise anterior. O hCG apresenta a desvantagem de induzir a formação de anticorpos após algumas injeções sucessivas, por isso é priorizada a utilização desse indutor apenas no início e no final da estação de monta, pois existe a possibilidade das éguas não apresentarem níveis mínimos de LH na hipófise e, com isso, a utilização de GnRH nesse período pode não ter efeito. Após a indução, a maioria das éguas ovulavam em um período entre 36h e 48h.

Antes da inseminação artificial de cada égua com sêmen fresco ou refrigerado, a cauda era enfaixada e era realizada a lavagem da vulva e períneo com água e detergente neutro, o excesso de água era retirado com papel toalha e a região da vulva e períneo era encharcada com álcool 70%. A mão enluvada e lubrificada com gel estéril era inserida na vagina juntamente com a pipeta para inseminação, após transpassar a pipeta pela cérvix, o sêmen era depositado no lúmen uterino.

O mesmo protocolo foi utilizado para éguas inseminadas com sêmen congelado, porém o controle da ovulação foi mais rigoroso. Após 36 h da indução da ovulação, o controle folicular passou a ser realizado a cada duas horas, até que fosse constatada a ovulação. Assim, a inseminação era realizada o mais próximo possível da ovulação. Além disso, o sêmen era depositado no corno uterino do lado correspondente à ovulação.

7.4.6. Colheita de embrião:

As colheitas foram realizadas pelo método transcervical no oitavo dia após a ovulação da doadora, a limpeza da vulva e do períneo era realizada de forma semelhante a limpeza realizada na inseminação artificial. O sistema utilizado era aberto de uma via, com cateter de colheita de embriões para éguas da Minitube® de

32 mm, inserido na vagina com a mão enluvada e lubrificada. Após transpassar pela cérvix o balão foi inflado com 30 mL de ar. O lavado era realizado com ringer lactato, em algumas éguas utilizando 1 L e em outras até 1,5 L dessa solução. O fluxo era controlado por pinça hemostática, sendo despejado em filtro coletor de embrião aberto. Após quatro lavados, o conteúdo do filtro era despejado em uma placa de petri previamente riscada em sua parte inferior, e levado ao estereomicroscópio, para o rastreamento do embrião sob o aumento de 10x. Quando o embrião era localizado, este era lavado 10 vezes em meio de manutenção de embrião. Após a lavagem, o embrião era aspirado para uma palheta de 0,5 mL, contendo três colunas de meio de manutenção separadas por duas colunas de ar, sendo que o embrião era aspirado na segunda coluna de meio de manutenção. Dessa forma, o embrião estava pronto para ser transferido para uma égua receptora.

7.4.7. Inovulação de embrião:

Previamente à inovulação do embrião, a cauda foi enfaixada e foi realizada a lavagem da vulva e do períneo com detergente neutro, o excesso de água foi retirado com papel toalha, finalizando a limpeza com álcool 70%. O embrião colhido na propriedade ou transportado refrigerado era envasado em palheta de 0,5 mL, e acoplado a uma bainha e a um inovulador francês para palhetas de 0,5 mL, protegido por camisa sanitária e em seguida inovulado via transcervical em uma receptora, previamente selecionada de acordo com o dia da ovulação D 4 a D 8, com presença de corpo lúteo íntegro, ou que tenha sido realizado protocolo hormonal para égua em anestro. O tônus de útero entre dois e três e homogeneidade entre dois e três, além de presença de linha de colabamento bem visível. Após a inovulação, era aplicado 5 mL de progesterona intramuscular em todas as éguas.

7.4.8. Diagnóstico de Prenhez:

O diagnóstico de gestação era realizado a partir da visualização da vesícula embrionária, por meio de ultrassonografia, aos 15 dias, independente se a prenhez era proveniente de monta natural, inseminação artificial com sêmen fresco, refrigerado ou congelado, ou de uma transferência de embrião. Caso a vesícula não fosse visualizada, a ultrassonografia era repetida aos 20 dias para a confirmação do

diagnóstico. Após a confirmação da gestação, a égua era avaliada novamente aos 30 dias e aos 60 dias de gestação. Em alguns casos era possível realizar a sexagem fetal, entre 90 e 150 dias de gestação, através da observação das gônadas ou da genitália.

7.5. CONCLUSÃO

O estágio realizado na Fazenda Sete Lagoas foi de grande importância, pois possibilitou o aprendizado teórico e prático de todo o processo de reprodução equina. Todas as expectativas com relação ao estágio supervisionado foram alcançadas, além de despertar um grande interesse em um maior aprofundamento dentro dessa área através de prática e de estudo.

ANEXO I

Motilidade total e progressiva do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, centrifugados com leite desnatado e diluente comercial, avaliados por sistema computadorizado, pós-descongelamento

Parâmetro	Motilidade Total (%)		Motilidade Progressiva (%)	
	Leite	Controle	Leite	Controle
Cavalo 1	54	45	9	13
Cavalo 2	23	14	5	1
Cavalo 3	50	62	13	19
Cavalo 4	48	64	12	24
Cavalo 5	33	34	3	10
Cavalo 6	36	47	9	15
Cavalo 7	24	33	4	4

Velocidade Média da Trajetória (VAP), Velocidade Linear Progressiva (VSL) e Velocidade Curvilínea (VCL) do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, centrifugados com leite desnatado e diluente comercial, avaliados por sistema computadorizado, pós-descongelamento

Parâmetro	VAP (µm/s)		VSL (µm/s)		VCL (µm/s)	
	Leite	Controle	Leite	Controle	Leite	Controle
Cavalo 1	35,4	42,1	30,5	35,7	57,2	64,3
Cavalo 2	40,5	39,1	35,1	30,1	69,3	74,5
Cavalo 3	48,2	49,8	37,1	36,9	86,4	89,4
Cavalo 4	42,8	48,7	35,4	41,0	77,3	82,7
Cavalo 5	38,7	41,6	30,8	36,5	75,6	75,2
Cavalo 6	45,9	48,6	34,8	39,8	85,5	87,0
Cavalo 7	39,3	37,7	32,5	31,4	72,4	68,3

Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), Frequência de Bateimento Flagelar Cruzado (BCF), Retilinearidade (STR) e Linearidade (LIN) do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, centrifugados com leite desnatado e diluente comercial, avaliados por sistema computadorizado, pós-descongelamento

Parâmetro	ALH (µm)		BCF (Hz)		STR (%)		LIN (%)	
	Leite	Controle	Leite	Controle	Leite	Controle	Leite	Controle
Cavalo 1	3,0	2,6	43,2	44,3	86	85	55	57
Cavalo 2	3,5	4,0	44,2	45,0	86	79	53	44

Cavalo 3	3,7	4,0	45,7	44,6	77	73	44	41
Cavalo 4	3,3	3,2	46,5	47,8	82	84	47	50
Cavalo 5	3,6	3,3	41,4	45,9	82	88	42	49
Cavalo 6	4,6	3,1	40,7	43,1	77	83	42	47
Cavalo 7	5,3	3,8	43,2	41,6	82	84	46	47

Integridade de membrana plasmática do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, centrifugados com leite desnatado e diluente comercial, avaliado por sonda de fluorescência, pós-descongelamento

Membrana Plasmática	Íntegra (%)		Lesada (%)	
Tratamento	Controle	Leite	Controle	Leite
Cavalo 1	68	66	32	34
Cavalo 2	45	70	55	30
Cavalo 3	60	68	40	32
Cavalo 4	36	46	64	54
Cavalo 5	49	59	51	41
Cavalo 6	54	60	46	40
Cavalo 7	62	52	38	48

Integridade de membrana acrossomal do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, centrifugados com leite desnatado e diluente comercial, avaliado por sonda de fluorescência, pós-descongelamento

Membrana Acrossomal	Íntegra (%)		Lesada (%)	
Tratamento	Controle	Leite	Controle	Leite
Cavalo 1	94	98	6	2
Cavalo 2	98	96	2	4
Cavalo 3	88	97	12	3
Cavalo 4	98	92	2	8
Cavalo 5	89	91	11	9
Cavalo 6	96	87	4	13
Cavalo 7	90	95	10	5

Viabilidade espermática do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, centrifugados com leite desnatado e diluente comercial, avaliado por corante supravital eosina-nigrosina, pós-descongelamento

Viabilidade Espermática	Viável (%)		Não viável (%)	
	Controle	Leite	Controle	Leite
Cavalo 1	91	90	9	10
Cavalo 2	78	73	22	27
Cavalo 3	86	84	14	16
Cavalo 4	88	88	12	12
Cavalo 5	87	83	13	17
Cavalo 6	76	70	24	30
Cavalo 7	82	83	18	17

ANEXO II

SETUP – HAMILTON THORNE BIOSCIENCES (Ultimate – Sperm Analyzer)

CARACTERÍSTICA	AJUSTE
Número de imagens adquiridas	45
Taxa de aquisição das imagens	60Hz
Contraste mínimo de célula	70 pixels
Tamanho mínimo de célula	4 pixels
Contraste para células imóveis	30 pixels
Limite inferior para índice retilíneo	60%
Referência de VAP para células lentas	20,0 $\mu\text{m/s}$
VAP mínimo para células progressivas	50,0 $\mu\text{m/s}$
Referência de VSL para células lentas	20,0 $\mu\text{m/s}$
Limite superior de tamanho da célula	1,51 pixels
Limite inferior de tamanho da célula	0,32 pixels
Limite superior de intensidade da célula	1,19
Limite inferior de intensidade da célula	0,24
Limite superior de alongamento da célula	98%
Limite inferior de alongamento da célula	0%
Tamanho da cabeça estática	0,32 a 1,51
Intensidade da cabeça estática	0,62 a 1,20
Aumento	1,89
Temperatura	37°C

ANEXO III

Avaliação da integridade de membrana plasmática com sonda IP CFDA

Preparação da sonda estoque:

- I. Solução de estoque de diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) – manter em -20°C
 - 9,2 mg CFDA
 - 20 mL DMSO
- II. Solução estoque de iodeto de propídeo (IP) – manter em -20°C
 - 10 mg IP
 - 20 mL solução fisiológica
- III. Solução estoque de formoldeído – manter em 4°C
 - Formalina 40%
 - Solução fisiológica
 - Fazer diluição de 1:80
- IV. Solução de estoque de citrato de sódio 3% - manter em 4°C
 - 3 g de citrato de sódio
 - 100 mL de solução fisiológica

Solução de trabalho – preparar no dia de uso e manter refrigerada

Solução I – 20 µL

Solução II – 10 µL

Solução III – 10 µL

Solução IV – 960 µL

Preparação da amostra

10 µL de sêmen

30 µL de solução de trabalho

Deixar encubando por oito minutos no banho-maria a 37°C

Colocar uma gotícula na lâmina, cobrir com lamínula e fazer leitura.

- Espermatozoides vermelhos – membrana lesada
- Espermatozoides verdes – membrana íntegra

ANEXO IV

Avaliação da integridade acrossomal com sonda PNA

Preparação da sonda estoque:

- V. Solução de estoque de FICT-PNA (PNA) – manter em - 20°C
 - 1 mg PNA
 - 1 mL PBS
- VI. Solução estoque de iodeto de propídeo (IP) – manter em -20°C
 - 10 mg IP
 - 20 mL solução fisiológica
- VII. Solução estoque de formoldeído – manter em 4°C
 - Formalina 40%
 - Solução fisiológica
 - Fazer diluição de 1:80
- VIII. Solução de estoque de citrato de sódio 3% - manter em 4°C
 - 3 g de citrato de sódio
 - 100 mL de solução fisiológica

Solução de trabalho – preparar no dia de uso e manter refrigerada

Solução I – 20 µL

Solução II – 10 µL

Solução III – 10 µL

Solução IV – 960 µL

Preparação da amostra

10 µL de sêmen

30 µL de solução de trabalho

Deixar encubando por oito minutos no banho-maria a 37°C

Colocar uma gotícula na lâmina, cobrir com lamínula e fazer leitura.

- Espermatozoide vivo intacto – não são observados na fluorescência, apenas em campo claro

- Espermatozoide vivo com acrossoma reagido – contorno verde na região do acrossoma
- Espermatozoide morto intacto – corados de vermelho
- Espermatozoide morto com acrossoma reagido – espermatozoide corado de vermelho com acrossoma corado de verde